

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICA
EN MATER

ORG. RELACION MUNT



(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C12N 1/06	A2	(11) Número de publicación internacional: WO 96/02629
		(43) Fecha de publicación internacional: 1 de Febrero de 1996 (01.02.96)

<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES95/00088</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 14 de Julio de 1995 (14.07.95)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9401536 14 de Julio de 1994 (14.07.94) ES</p> <p>(71) S licitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Rectorado, Avenida de Séneca, 2, E-28040 Madrid (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): NOMBELA CANO, César [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). ALVAREZ ALVAREZ, Pablo [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). SAMPEDRO MARTINEZ, Marta [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). DE LA FUENTE CARRETERO, Jesús [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). MOLINA MARTIN, María [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES).</p>	<p>(81) Estados designados: AU, CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe.</i></p>
---	---

(54) Title: **PROCESS FOR RELEASING HETEROLOG PROTEINS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE STRAINS**

(54) Título: **PROCEDIMIENTO DE LIBERACION DE PROTEINAS HETEROLOGAS DE CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

(57) Abstract

The invention relates to a process for releasing intracellular heterolog proteins in the *Saccharomyces Cerevisiae* yeast based on the osmotic sensitivity which confers the mutation *slt2* at the temperature of 37 °C. Said osmotic sensitivity may be used for releasing the intracellular content either by change of temperature of the culture from 24° to 37° C, or by transfer of grown cells in an osmotically stabilized medium at said second temperature to a non-stabilized medium. In both cases, the cells undergo a lysis and release their intracellular content and, after centrifugation to eliminate the cellular rests, a preparation of proteins is obtained which is appropriate to initiate a process of purification of the protein of interest. This process results in a cost reduction since the use of equipment is avoided and the preparation of proteins which is obtained contains less impurities than that which is obtained through other processes.

(57) Resumen

Se describe un procedimiento para lograr la liberación de proteínas heterólogas intracelulares en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* basado en la sensibilidad osmótica que confiere la mutación *slt2* a la temperatura de 37 °C. Esta sensibilidad osmótica puede ser utilizada para la liberación del contenido intracelular bien por cambio en la temperatura del cultivo de 24° a 37 °C, o bien por transferencia de células crecidas en medio estabilizado osmóticamente a esta ultima temperatura a un medio no estabilizado. En ambos casos las células se lisan liberando su contenido intracelular obteniéndose, tras una centrifugación que elimina los restos celulares, una preparación de proteínas apta para iniciar un proceso de purificación de la proteína de interés. Este procedimiento resulta en un abaratamiento del proceso al evitar el uso de maquinaria, y la preparación de proteínas que se obtiene contiene menos impurezas que la obtenida por otros procesos.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	GB	Reino Unido	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Níger
BE	Bélgica	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BF	Burkina Faso	HU	Hungría	NO	Noruega
BG	Bulgaria	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelandia
BJ	Benin	IT	Italia	PL	Polonia
BR	Brasil	JP	Japón	PT	Portugal
BY	Belarús	KE	Kenya	RO	Rumania
CA	Canadá	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CF	República Centroafricana	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CG	Congo	KR	República de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KZ	Kazajistán	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LV	Letonia	TG	Togo
CZ	República Checa	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DE	Alemania	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tabago
DK	Dinamarca	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	US	Estados Unidos de América
FI	Finlandia	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistán
FR	Francia			VN	Viet Nam
GA	Gabón				

TITULO

Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

5

OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se encuadra dentro de la Biotecnología y en concreto en el campo de la expresión, producción y liberación de proteínas heterólogas en la levadura. La invención proporciona un método para llevar a cabo dicha liberación, basado en tratamientos sencillos de determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, portadoras de una mutación que conduce a la liberación del contenido intracelular, 15 obteniéndose de esta forma preparaciones de proteínas que se separan fácilmente de la mayor parte de los materiales celulares indeseables presentes en dichas preparaciones, tales como paredes celulares. Las preparaciones de proteínas así obtenidas pueden ser sometidas a los procesos de extracción y purificación correspondientes. La mutación de la que son portadoras las células de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en el 20 procedimiento objeto de esta invención afecta al gen denominado *SLT2*; como consecuencia de dicha mutación las células pierden su integridad en determinadas condiciones lo que conduce a la liberación de su contenido de proteínas solubles. El conocimiento existente acerca de la función del citado gen, en buena medida desarrollado en nuestro laboratorio, permite aprovechar las características de este tipo 25 de células mutantes para optimizar dicha liberación de proteínas. El procedimiento objeto de esta invención representa una alternativa a otros procedimientos de liberación de proteínas heterólogas de levadura tales como la rotura mecánica, química o enzimática de la integridad celular.

30 ANTECEDENTES

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo bien conocido y utilizado ampliamente en Biotecnología para la expresión y producción de proteínas heterólogas. Destacan varias características de esta especie en relación con la utilidad 35 de la misma:

HOJA SUSTITUIDA

- es un organismo eucariótico.

- se trata de un organismo del tipo GRAS ("Generally Recognized As Safe") según la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos. es decir generalmente reconocido como seguro, por ausencia de posibles contaminantes víricos y pirógenos; esto lo convierte en un hospedador apto para la producción de proteínas con uso alimentario y terapéutico.

- existe un amplio conocimiento de su comportamiento a gran escala en fermentador por su uso en fermentaciones tradicionales.

10 Las levaduras se utilizan para producir una serie proteínas heterólogas. de alto valor añadido, como consecuencia de un proceso de expresión de los correspondientes genes, en procesos en los que la proteína se acumula a nivel intracelular. Entre éstas están el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBV) que ha dado origen al desarrollo de una vacuna recombinante ya en el mercado, la proinsulina humana, la superóxido dismutasa humana, proteínas VLP como presentadoras de antígenos del virus HIV1 y el antígeno que ha permitido desarrollar una vacuna contra la malaria. Las posibilidades en este sentido se recogen ampliamente en Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992, Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast 8:423-488.

20

Para la recuperación de estas proteínas heterólogas producidas de forma intracelular normalmente se recurre a la rotura de las células. Los métodos descritos tradicionales para lograr dicha rotura celular son drásticos debido a la dureza de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* y pueden consistir en:

25 - rotura mecánica con homogeneizadores a presión (Schütte, H. and Kula, M.R. 1990. Pilot and process-scale techniques for cell disruption. Biotechnol. Appl. Biochem. 12:599-620).

- rotura química empleando detergentes químicos (Breddam, K. and Beenfeldt, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:323-329).

30 - rotura enzimática empleando unas mezclas complejas de enzimas líticos (Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. Bio/Technology 11:214-217).

35

Estos métodos presentan como inconvenientes la posible degradación de los polipéptidos debido a las altas presiones que pueden sufrir en los homogeneizadores, la posible contaminación que pueden suponer los compuestos químicos utilizados para la

extracción de la proteína que no siempre son fáciles de eliminar y, en el caso del uso de enzimas líticos, la contaminación con proteasas (Asenjo, J.A., Ventom.A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. Bio/Technology 11:214-217) que suelen estar presentes en los aludidos complejos de enzimas líticos. La alternativa de llevar a cabo una purificación para eliminar las proteasas aumenta el valor del complejo lítico que ya de por sí resulta caro.

El problema técnico cuya resolución nos planteamos es lograr la liberación de proteínas heterólogas producidas intracelularmente en levadura, sin necesidad de tener que realizar un proceso de rotura mecánica, química o enzimática de las células. Para ello nos basamos en el uso de determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* portadoras de la mutación *slt2*, es decir que afecta al gen *SLT2* descubierto y clonado en nuestro laboratorio (Torres, L., Martín, H., García-Saez, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. and Nombela, C. 1991. A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* "lyt2 mutants. Mol. Microbiol. 5:2845-2854; Fuente, J.M., Vázquez, A., González, M., Sánchez, M., Molina, M. and Nombela, C. 1993 Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:763-769).

El gen *SLT2* codifica una proteína con actividad fosforilante de proteínas, que se encuadra en el grupo de las llamadas "Proteína quinasas tipo MAP" (Mitogen Activated Protein) (Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M. and Nombela, C. 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37°C. Mol. Gen. Genet. 241: 177-184) y que cuya acción biológica parece enmarcarse en una ruta de transmisión de señales activadas por la proteína quinasa C1, desconociéndose actualmente la señal que desencadena la activación de la ruta así como el sustrato final de la misma.

30

Otro factor a tener en cuenta a la hora de abordar la expresión de proteínas heterólogas en levaduras es la posibilidad de degradación proteolítica inespecífica de la correspondiente proteína, producida por acción de las proteasas de la levadura especialmente de las de origen vacuolar como son las codificadas por los genes *PEP4* y *PRB1* (Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. 1993. Increased activity of a model heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* strains with reduced vacuolar proteinases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:211-215; Jones, E.W. 1991. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. Meth. in Enzymol. 194:428-453;

Pohlig, G., Zimmermann, W. and Heim, J. 1991. Influence of yeast proteases on hirudin expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Biomed. Biochim. Acta 50:711-716). Por ello, también hemos desarrollado cepas más adecuadas para nuestra invención, es decir portadoras del carácter lítico (*slt2*), pero que son también deficientes en proteasas vacuolares.

Los primeros estudios de liberación de proteínas heterólogas de acuerdo con el procedimiento de esta invención se realizaron induciendo la lisis celular mediante un choque térmico, consistente en elevar la temperatura del cultivo desde 24°C a 37°C, alcanzándose a las 6 a 8 horas la máxima liberación de proteínas, por ser ese el tiempo requerido para lograr una lisis del cultivo.

EXPLICACION Y DESCRIPCION DE LA INVENCION

El proceso objeto de patente consiste en la utilización de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, deficientes en la función del gen *SLT2*, cuyo fenotipo se caracteriza por:

- crecimiento termosensible, de forma que las células se desarrollan bien a 24°C pero dejan de crecer y se lisan cuando se eleva la temperatura a 37°C, produciéndose la lisis celular con liberación del contenido intracelular al medio externo.

- las células mutantes *slt2* resultan protegidas frente a las deficiencias indicadas anteriormente, es decir termosensibilidad y lisis a 37°C, por estabilización osmótica del medio con sorbitol 0.5M o NaCl 1.5%, lo que es indicativo de que la proteína codificada por el referido gen es necesaria para la formación de una pared celular osmóticamente estable a la temperatura de 37°C.

El objetivo de la invención es el aprovechamiento de estas características fenotípicas para lograr la liberación de proteínas heterólogas producidas intracelularmente. Dicha liberación se basa en la lisis celular que se produce en determinadas condiciones y que conduce a la liberación de contenido intracelular que dichas cepas mutantes presentan cuando la temperatura de crecimiento se eleva de 24°C a 37°C o cuando, después de crecer a 37°C pero en medio estabilizado osmóticamente, son sometidas a un choque osmótico por simple resuspensión de las células en un medio carente de dicho estabilizador osmótico. Se obtiene de esta forma

HOJA SUSTITUIDA

una preparación de proteínas, que se separa de los restos del material celular por centrifugación simple, y en la que está presentes las proteínas heterólogas intracelulares en cantidades superiores al 50% del total de proteína intracelular producida.

5

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* desarrolladas para llevar a cabo la invención son:

- LD1: es una cepa diploide portadora de la mutación *slt2* con las características fenotípicas enunciadas con anterioridad. Su genotipo es: *MATa/MATα*,
10 *slt2D-35/slt2D-35*, *leu2-3.112/leu2-3.112*, *his4Δ34/his4Δ34*.

- LHDP1: *MAT a*, *slt2D-35*, *ade2-101*, *leu2-3.112*, *pep4::HIS3*, *pbr1Δ1.6R*.
Muestra las mismas características fenotípicas referidas a lisis, siendo además deficiente en proteasas vacuolares Pep4 y Prb1 responsables de la proteólisis inespecífica.

15

Ambas cepas se encuentran depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) sita en la Universidad de Valencia. Los números de acceso son: 10815 para la cepa LD1 y 10816 para la cepa LHDP1.

20

El procedimiento de liberación de proteínas se puede llevar a cabo según se indica en las Figuras I y II por una de las siguientes alternativas:

A) Liberación de proteínas por choque osmótico. Las fases del proceso se describen en la Figura I.

25

-crecimiento de la cepa mutante en el gen *SLT2* a la temperatura restrictiva de 37°C en presencia de un estabilizador osmótico hasta mitad de la fase exponencial.

-separación de las células del medio de cultivo por centrifugación guardando las células.

30

-choque osmótico de las células mediante resuspensión de las mismas en agua, lo que conduce a la lisis de las mismas con liberación de las proteínas intracelulares, entre ellas la proteína heteróloga de interés.

35

-eliminación de los restos celulares por centrifugación obteniéndose una preparación cruda de proteínas intracelulares entre las que se encuentra la proteína de interés, y preparación que es apta para iniciar procesos de purificación.

B) Liberación de proteínas por choque térmico. Las fases del proceso son:

-crecimiento de la cepa mutante en el gen *SLT2* a la temperatura permisiva de 24°C hasta la mitad de la fase exponencial.

5 -choque térmico del cultivo mediante elevación de la temperatura de crecimiento a 37°C, lo que produce la lisis de las células al cabo 6-8 horas de incubación a esa temperatura, con liberación del contenido intracelular al medio de cultivo.

10 -separación de los restos celulares del medio de cultivo (que contiene las proteínas liberadas como resultado de la lisis celular) por centrifugación, obteniéndose al igual que en el caso anterior una preparación cruda de proteínas, portadora de la proteína de interés, apta para abordar procesos de purificación.

15 En la Figura II se explican los parámetros que nos indican que existe lisis del cultivo con liberación del contenido intracelular al medio de cultivo.

Las principales ventajas que presenta la invención son las siguientes:

20 - permite lograr una liberación suave y rápida de las proteínas evitando el uso de altas presiones en los homogeneizadores (Schütte, H. and Kula, M.R. 1990. Pilot and process-scale techniques for cell disruption. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12:599-620), de productos químicos (Breddam, K. and Beenfeldt, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:323-329) y de enzimas líticos (Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. *Bio/Technology* 11:214-217) para digerir la pared; lo que además se traduce en un abaratamiento del proceso.

30 - evita las contaminaciones de la preparación de proteínas que se pueden dar en el caso de extracción con productos químicos que añaden impurezas a las preparaciones de proteínas no siempre fáciles de eliminar (Breddam, K. and Beenfeldt, T. 1991. Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:323-329) o de las contaminaciones con proteasas en el caso de extracción con enzimas líticos que se traduce en degradación de los polipéptidos (Asenjo, J.A., Ventom, A.M., Huang, R.B. and Andrews, B.A. 1993. Selective release of recombinant proteins particles (VLPs) from yeast using a pure lytic glucanase enzyme. *Bio/Technology* 11:214-217).

35 - la posibilidad de concentrar el volumen de cultivo inicial, al producir el choque osmótico junto al hecho de que las proteínas heterólogas pueden ser

HOJA SUSTITUIDA

expresadas bajo el control de promotores fuertes lo que significa que su proporción relativa puede ser elevada lo que facilita la posterior purificación de la misma.

- la principal ventaja respecto al sistema similar basado en el empleo de la mutación *srbl* es la mayor sensibilidad al choque osmótico de la mutación *slt2* en la
- 5 que 60-70% de las células se lisan frente a un 20% de las células mutadas en *srbl* (Bröker, M. 1994. Isolation of recombinant proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by use of osmotically fragile mutant strains. Biotechniques 16:604-610).

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Para facilitar la comprensión de las características de la invención se adjuntan dos Figuras explicativas.

- 5 La **Figura I** muestra las fases del proceso de liberación de proteínas heterólogas intracelulares en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas en el gen *SLT2* por medio de un choque osmótico.

- 10 En los cuatro paneles de la **Figura II** se describe la liberación de proteínas homólogas (fosfatasa alcalina) y heterólogas (cloranfenicol acetil transferasa) de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* LD1 (A,C) y LHDP1 (B,D) transformadas con el plásmido pCH100L en condiciones de expresión de la mutación *slt2*. Cultivos realizados en un fermentador de 10l incubados a 24°C todo el cultivo (A y B) o cambiados a 37°C (C y D) (▼, cambio de temperatura). Los parámetros medidos fueron: +, viabilidad medida como porcentaje de células IP(-), ■, Densidad Óptica a 15 600 nm (DO); X, Proteína total en el medio de cultivo (Prot.); *, actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en extractos celulares (EC) y ●, medio de cultivo (M) como unidades por mililitro; ✕, actividad fosfatasa alcalina (PA) en extractos celulares (EC) y ▲, medio de cultivo (M) como unidades por mililitro.

EXPOSICION DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

5 A. continuación expondremos por medio de un ejemplo, no limitativo de su alcance, un modo de realización de la invención en las dos modalidades expuestas anteriormente.

10 Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas son las descritas con anterioridad en el apartado de "Explicación y Descripción de la Invención"; además con carácter optativo se puede utilizar una cepa silvestre para el carácter lítico que sirva de control negativo en el experimento, por ejemplo nosotros hemos utilizado:

15 - BJ5461: es una cepa silvestre para el gen *SLT2* accesible al público en la colección denominada Yeast Genetic Stock Center (Mortimer, R.K. and Contopoulou, R. Yeast Genetic Stock Center Catalogue. Seventh edition 1991). No obstante se puede emplear como cepa control para los experimentos cualquier cepa no lítica.

20 Las tres cepas (LD1, LHDP1 y BJ5461) se transforman con el plásmido pCH100L (Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1986. An efficient chloramphenicol- resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Gene 45:149-158), modificado en nuestro laboratorio introduciendo un marcador *LEU2* (leucina) para poder seleccionar transformantes. El plásmido codifica para la proteína CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa) de origen bacteriano y responsable de la resistencia a cloranfenicol y que es una proteína heteróloga para la levadura y además es producida de forma intracelular y por tanto sólo será detectable en el medio
25 de cultivo como consecuencia de lisis celular.

Estudios previos han demostrado una buena estabilidad del plásmido lo que permite trabajar con medio no selectivo tipo YEPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%) que permite un crecimiento más rápido y una mejor expresión del
30 fenotipo lítico.

35 **A) Liberación de proteínas por choque osmótico.** Las fases del proceso están resumizadas en la Figura I, incluida en el apartado de "Explicación y descripción de la invención".

Las cepas transformadas se cultivan en medio YEPD líquido suplementado con un estabilizador osmótico (sorbitol 0.5M, NaCl 1.5%) a la temperatura de 37°C en un agitador termostatzado hasta la mitad de la fase exponencial. Antes de recoger las

HOJA SUSTITUIDA

células para separarlas del medio de cultivo se toman muestras de sobrenadante y de células para obtener valores de referencia acerca de la liberación de CAT al medio externo (son negativos debido a que la ausencia de lisis hace que no haya liberación de contenido intracelular al medio externo). Los valores que se van a medir son la actividad de CAT en el extracto celular y en el sobrenadante antes y después del choque osmótico para establecer la cantidad de proteína liberada desde las células al sobrenadante, siguiendo un método colorimétrico descrito por Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1986. An efficient chloramphenicol- resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Gene 45:149-158). Como se indica en la Figura I las células son separadas por una centrifugación a 5000rpm durante 5', siendo a continuación resuspendidas en agua, momento en el cual se vuelve a tomar otra muestra separando por centrifugación a 5000rpm 10 min los restos celulares y analizando la cantidad de CAT presente en las células y en sobrenadante mostrándose los datos en la tabla I, esta preparación obtenida tras la segunda centrifugación deja una preparación de proteínas lista para acometer un proceso de purificación de la proteína de interés.

Como era de esperar la cepa silvestre, en este caso BJ5461, no es osmóticamente sensible y no se observa aparición de actividad CAT en el sobrenadante, a diferencia de las otras dos cepas que sí son sensibles al choque osmótico y que presentan un 60-70% de su actividad en el sobrenadante. Destaca la mayor productividad de la cepa LHDP1 en concordancia con lo publicado en otros trabajos (Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. 1992, Foreign gene expression in yeast: a review. Yeast 8:423-488; Wingfield, J.M. and Dickinson, J.R. 1993. Increased activity of a model heterologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* strains with reduced vacuolar proteinases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:211-215). Estos datos están apoyados en medidas paralelas de proteína total presente en los extractos celulares y en los sobrenadantes siguiendo el método colorimétrico descrito por Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72:248-254, mostrando perfiles similares a los de la actividad CAT.

TABLA I

ACTIVIDAD CAT (UE/ml)					
YEPD+ sorbitol 37°C			H ₂ O		
Cepas	Extracto celular	Sobrenadante	Extracto celular	Sobrenadante	%CAT §
BJ5461	100	n.d.	98	n.d.	0
LD1	75	n.d.	23	50	70
LHDP1	220	n.d.	80	130	60

n.d.: no detectado

§: %CAT liberado al sobrenadante

Tabla I: Liberación de la proteína heteróloga CAT por choque osmótico de cepas *slt2*. Se tomaron muestras de igual densidad celular y la actividad CAT fue determinada en: extracto celular (antes y después del choque osmótico), sobrenadante de medio de cultivo o de agua en la que se resuspendieron las células después del choque osmótico.

B) Liberación de proteínas por choque térmico. Los datos obtenidos en experimentos tipo se muestran en la Figura II.

Los experimentos en esta modalidad se han realizado utilizando un fermentador con cuba de 10l de volumen de trabajo modelo BIOSTAT E (Braun); lo que confiere a los resultados un valor adicional ya que un fermentador de estas características

5 representa una escala superior a la del matraz y se acerca a la escala de planta piloto. Las condiciones de cultivo fueron:

- medio de cultivo YEPD
- temperatura: inicial de 24°C elevándose la misma a 37°C a la mitad de

10 la fase exponencial, para provocar la lisis y la consiguiente liberación de proteínas al medio de cultivo.

- datos técnicos:
- el inóculo se obtenía cultivando las células a 24°C en medio mínimo sin leucina para asegurar un 100% de células portadoras del plásmido.

15 Su volumen era de 500ml y correspondía a un cultivo en fase estacionaria.

- el cultivo era de tipo discontinuo (batch).
- la velocidad de agitación era de 300rpm, el pH oscilaba entre 4 y 6, el flujo de entrada de aire 5 l/min.

20 -toma de muestras: se realizaron tomas periódicas a 24° y 37°C con el fin de seguir la evolución de la densidad óptica y la viabilidad del cultivo. Además para evaluar la proteína total y la actividad enzimática CAT se tomaron una o dos muestras antes del choque térmico y tras este a intervalos más cortos al principio (3horas) incrementándose hasta las 24-30 horas posteriores al cambio de temperatura.

25 Con las condiciones mencionadas anteriormente el cultivo se mantenía a 24°C hasta una densidad óptica entre 1 y 1.5; en ese momento se cambiaba la temperatura del cultivo a 37°C para provocar la lisis de las células. Lo anterior y lo expuesto a continuación se refiere a datos mostrados en la Figura II en sus diferentes apartados.

30 Para seguir la lisis se evaluaron los diferentes parámetros:

- lisis celular, que lógicamente significa la muerte celular, se medía siguiendo un método desarrollado en nuestro laboratorio consistente en medir el porcentaje de población celular que es teñida por el fluorocromo yoduro de propidio mediante la técnica de citometría de flujo (Fuente, J.M., Alvarez, A., Nombela, C. and Sanchez, M. 1992. Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* autolytic mutants and protoplasts. Yeast 8:39-45) y que equivale a un perfil de la viabilidad del cultivo.

-al igual que en el caso de liberación de proteínas por choque osmótico se medía la actividad enzimática de CAT y la proteína total. Se considera proteína liberada al incremento sobre el valor basal medido en el cultivo a 24°C inmediatamente antes de cambiar la temperatura a 37°C.

5

Los resultados expuestos en la Figura II (pág.15) corresponden a fermentaciones tipo de las cepas LD1 y LHDP1. Las gráficas A (LD1) y C (LHDP1) a sendas fermentaciones realizadas a 24°C con el objeto de seguir el perfil de dichas cepas a su temperatura permisiva y poder establecer que en ningún momento se produce ni lisis (no se observa disminución del perfil de viabilidad) ni, por tanto, liberación de proteínas al medio de cultivo (la actividad CAT únicamente es detectable en el extracto celular, es decir en el interior de las células). Se puede decir que son dos fermentaciones que sirven de control para la comparación con las fermentaciones realizadas con choque térmico en las mismas cepas que nos permiten evaluar con más precisión el efecto de dicho choque térmico. En las gráficas B (DL1) y D (LHDP1), correspondientes a fermentaciones con choque térmico, se observan los siguientes fenómenos tras el cambio de temperatura, representado por un trazo vertical continuo en la gráfica:

-en ambas se observa una acusada pérdida de viabilidad hasta niveles en torno al 20 a 30% de células viables, como resultado de la expresión del fenotipo de la mutación en el gen *SLT2* a la temperatura de 37°C.

-las dos cepas presentan liberación de proteínas al medio externo representada por el incremento observado en las proteínas totales, medidas por el método Bradford (Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72:248-254), y en la actividad enzimática CAT (Hadfield, C., Cashmore, A.M. and Meacock, P.A. 1986. An efficient chloramphenicol-resistance marker for *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *Gene* 45:149-158). Sin embargo la estabilidad de la enzima CAT demuestra ser superior en la cepa LHDP1 que en la LD1, debido probablemente a no estar expuesta a la acción de las proteasas vacuolares Pep4 y Prb1 en el caso de la cepa LHDP1.

-al igual que en el caso del choque osmótico la separación de los restos celulares por centrifugación deja una preparación cruda de proteínas apta para emprender un proceso de purificación.

INDICACION RELATIVA AL DEPOSITO DE UN MICRO-ORGANISMO

14

(Regla 13 bis del PCT)

A. Las indicaciones se refieren al microorganismo mencionado en la descripción página <u>cinco</u> , línea <u>8 y 19</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO Otros depósitos están identificados en una hoja suplementaria <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución de depósito COLECCION ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO	
Dirección de la institución de depósito (comprendidos el distrito postal y el país) UNIVERSIDAD DE VALENCIA Dpto. Microbiología. FACULTAD CC. BIOLOGICAS CAMPUS DE BURJASOT 46100 BURJASOT (VALENCIA) ESPAÑA	
Fecha de depósito 4- julio- 1994	n° de orden SACCHAROMYCES CEREVISIAE CECT 10815
C. INDICACIONES SUPLEMENTARIAS (en caso necesario) Se adjunta una hoja separada para la continuación de estos datos <input type="checkbox"/>	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los estados designados)	
E. INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO (en caso necesario)	
Las indicaciones numeradas a continuación serán presentadas posteriormente en la Oficina internacional (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejem. "n° de orden del depósito")	

Reservado a la oficina receptora



Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional

Funcionario autorizado



Reservado a la Oficina internacional



Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:


Funcionario autorizado

15

(Regla 13 bis del PCT)

Reservado a la oficina receptora.

☒ Esta hoja ha sido recibida al mismo tiempo que la solicitud internacional

Funcionario autorizado 

Reservado a la Oficina internacional

☐ Esta hoja se ha recibido en la Oficina internacional el:

Funcionario autorizado

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de proteínas heterólogas y otros materiales intracelulares (como productos particulados tipo VLP) basado en el empleo de estirpes mutadas en genes que afectan a la integridad celular lo que da lugar a la liberación el contenido intracelular por expresión de la correspondiente mutación.
- 2.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación número 1 basado en la sensibilidad osmótica que confieren a las células mutaciones como las que afectan al gen *SLT2* generalmente a temperaturas no permisivas como la de 37°C.
- 3.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación números 1 y 2 caracterizado porque la obtención de preparaciones de proteínas heterólogas y productos particulados intracelulares se realiza por cualquier técnica que, produciendo la expresión de la mutación correspondiente, conduzca a la pérdida de integridad celular por la sensibilidad osmótica de las células.
- 4.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación número 3 caracterizado porque la expresión de las mutaciones puede provocarse en las células capaces de expresar proteínas heterólogas o productos intracelulares particulados (es decir transformadas con el gen o genes correspondientes) mediante choque térmico de cultivos, es decir elevación de la temperatura hasta niveles no permisivos en medios no protegidos osmóticamente, o por choque osmótico de células incubadas a temperatura no permisiva en medio osmóticamente protegido.
- 5.- Procedimiento para la obtención de proteínas heterólogas intracelulares y productos particulados caracterizado por el uso de otras especies de levadura diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* en mutantes autolíticos, afectados en genes homólogos del gen *SLT2* o en otros cuya mutación determine pérdida de la integridad celular, usando un choque osmótico o un choque térmico.

1/2

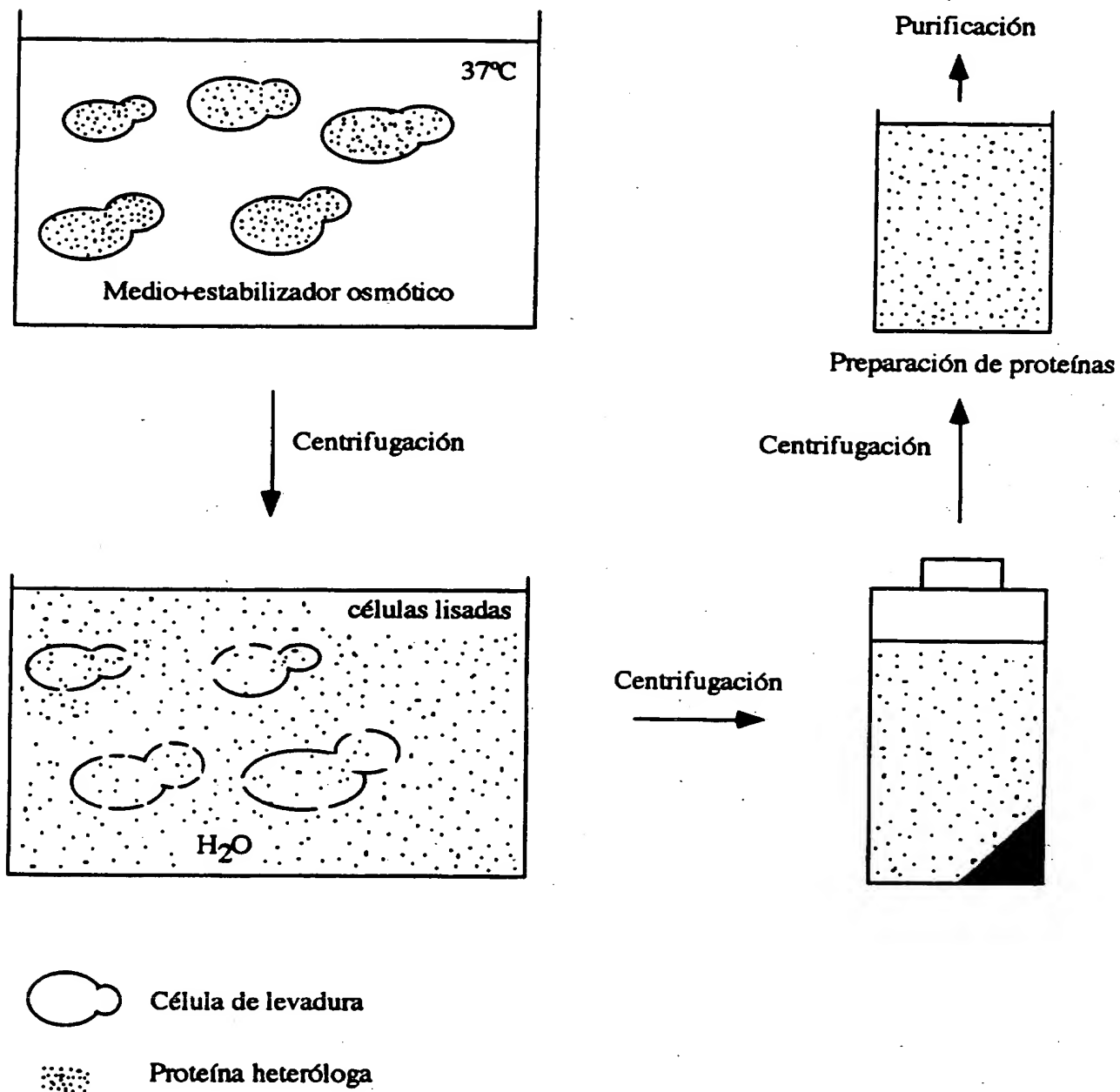


FIGURA I

2/2

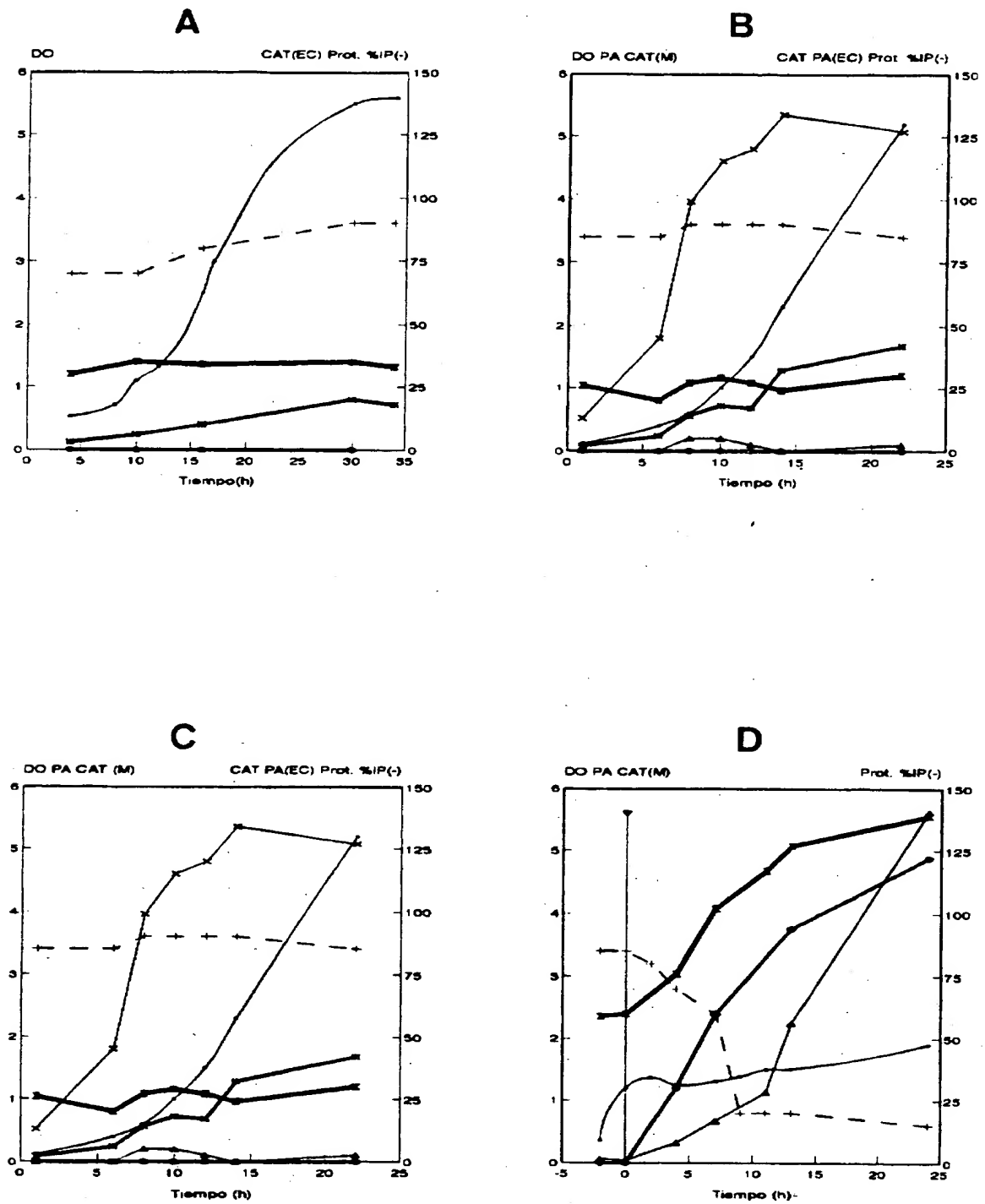


FIGURA II

PCTORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina InternacionalSOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ :

C12N 1/06

A3

(11) Número de publicación internacional:

WO 96/02629

(43) Fecha de publicación
internacional:

1 de Febrero de 1996 (01.02.96)

(21) Solicitud internacional: PCT/ES95/00088

(22) Fecha de la presentación internacional:
14 de Julio de 1995 (14.07.95)(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9401536 14 de Julio de 1994 (14.07.94) ES(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES];
Rectorado, Avenida de Séneca, 2, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): NOMBELA CANO, César
[ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de
Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES).
ALVAREZ ALVAREZ, Pablo [ES/ES]; Departamento de
Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Univer-
sitaria, E-28040 Madrid (ES). SAMPEDRO MARTINEZ,
Marta [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad
de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES).
DE LA FUENTE CARRETERO, Jesús [ES/ES]; Departamen-
to de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad
Universitaria, E-28040 Madrid (ES). MOLINA MARTIN,
María [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad
de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES).(81) Estados designados: AU, CA, JP, US, Patente europea (AT,
BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, SE).**Publicada***Con informe de búsqueda internacional.**Antes de la expiración del plazo previsto para la
modificación de las reivindicaciones, será publicada
nuevamente si se reciben tales modificaciones*(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda
internacional: 4 de abril de 1996 (04.04.96)

(54) Title: PROCESS FOR RELEASING HETEROLOG PROTEINS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE STRAINS

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE LIBERACION DE PROTEINAS HETEROLOGAS DE CEPAS DE SACCHAROMYCES CERE-
VISIAE**(57) Abstract**

The invention relates to a process for releasing intracellular heterolog proteins in the *Saccharomyces Cerevisiae* yeast based on the osmotic sensitivity which confers the mutation *slt2* at the temperature of 37 °C. Said osmotic sensitivity may be used for releasing the intracellular content either by change of temperature of the culture from 24° to 37° C, or by transfer of grown cells in an osmotically stabilized medium at said second temperature to a non-stabilized medium. In both cases, the cells undergo a lysis and release their intracellular content and, after centrifugation to eliminate the cellular rests, a preparation of proteins is obtained which is appropriate to initiate a process of purification of the protein of interest. This process results in a cost reduction since the use of equipment is avoided and the preparation of proteins which is obtained contains less impurities than that which is obtained through other processes.

(57) Resumen

Se describe un procedimiento para lograr la liberación de proteínas heterólogas intracelulares en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* basado en la sensibilidad osmótica que confiere la mutación *slt2* a la temperatura de 37 °C. Esta sensibilidad osmótica puede ser utilizada para la liberación del contenido intracelular bien por cambio en la temperatura del cultivo de 24° a 37 °C, o bien por transferencia de células crecidas en medio estabilizado osmóticamente a esta última temperatura a un medio no estabilizado. En ambos casos las células se lisan liberando su contenido intracelular obteniéndose, tras una centrifugación que elimina los restos celulares, una preparación de proteínas apta para iniciar un proceso de purificación de la proteína de interés. Este procedimiento resulta en un abaratamiento del proceso al evitar el uso de maquinaria, y la preparación de proteínas que se obtiene contiene menos impurezas que la obtenida por otros procesos.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	GB	Reino Unido	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Níger
BE	Bélgica	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BF	Burkina Faso	HU	Hungría	NO	Noruega
BG	Bulgaria	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BJ	Benin	IT	Italia	PL	Polonia
BR	Brasil	JP	Japón	PT	Portugal
BY	Belarús	KE	Kenya	RO	Rumania
CA	Canadá	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CF	República Centroafricana	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CG	Congo	KR	República de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KZ	Kazajistán	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LV	Letonia	TG	Togo
CZ	República Checa	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DE	Alemania	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tabago
DK	Dinamarca	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	US	Estados Unidos de América
FI	Finlandia	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistán
FR	Francia			VN	Viet Nam
GA	Gabón				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/ES 95/00088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 38, no. 6, pages 763-769, JESAS MANUEL DE LA FUENTE ET AL. 'Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures' cited in the application see page 768, left column, paragraph 3 - paragraph 4 see page 766, left column, paragraph 2 - paragraph 3 see page 764, right column, paragraph 3 see abstract --- -/--	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26-01-96

Date of mailing of the international search report

13-02-96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOTECHNIQUES, vol. 16, no. 4, NATICK US, pages 604-610, MICHAEL BRÖKER 'Isolation of recombinant proteins from Saccharomyces cerevisiae by use of osmotically fragile mutant strains' cited in the application see page 604, right column, paragraph 1 see page 610, left column, paragraph 3 ---	1,3
A	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 5, no. 11, pages 2845-2854, L. TORRES ET AL. 'A protein kinase gene complements the lytic phenotype of Saccharomyces cerevisiae lyt2 mutants' cited in the application see abstract see page 2845, right column, paragraph 3 - page 2847, left column, paragraph 1 see page 2850, left column, paragraph 3 - page 2851, left column, paragraph 2 ---	1-5
A	MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 241, no. 1-2, BERLIN DE, pages 177-184, HUMBERTO MARTÍN ET AL. 'Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37AC' cited in the application see abstract see page 179, right column, paragraph 4 - page 180, right column, paragraph 1 see page 181, right column, paragraph 2 - page 183, left column, paragraph 3 ---	1-5
P,X	J. BIOTECHNOL. (1994), 38(1), 81-8 CODEN: JBITD4;ISSN: 0168-1656, ALVAREZ, PABLO ET AL. 'A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity' see abstract see page 82, left column, paragraph 4 - right column, paragraph 1 see page 83, right column, last paragraph - page 87, left column, paragraph 3 -----	1-5

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES/96/00088

A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN

CIP 6 C12N1/06

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 6 C12N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	<p>APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 38, num. 6, páginas 763-769, JESAS MANUEL DE LA FUENTE ET AL. 'Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures' citado en la solicitud ver página 768, columna izquierda, párrafo 3 - párrafo 4 ver página 766, columna izquierda, párrafo 2 - párrafo 3 ver página 764, columna derecha, párrafo 3 ver resumen</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-4

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☐ Véase el Anexo de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

- *A* documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- *E* documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- *L* documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)
- *O* documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- *P* documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

T documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

X documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

Y documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

& documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

26-01-96

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

13-02-96

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Montero Lopez, B

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°
PCT/ES 95/00088

C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES		
Categoría	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
X	BIOTECHNIQUES, vol. 16, num. 4, NATICK US, páginas 604-610, MICHAEL BRÖKER 'Isolation of recombinant proteins from Saccharomyces cerevisiae by use of osmotically fragile mutant strains' citado en la solicitud ver página 604, columna derecha, párrafo 1 ver página 610, columna izquierda, párrafo 3	1,3
A	--- MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 5, num. 11, páginas 2845-2854, L. TORRES ET AL. 'A protein kinase gene complements the lytic phenotype of Saccharomyces cerevisiae lyt2 mutants' citado en la solicitud ver resumen ver página 2845, columna derecha, párrafo 3 - página 2847, columna izquierda, párrafo 1 ver página 2850, columna izquierda, párrafo 3 - página 2851, columna izquierda, párrafo 2	1-5
A	--- MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 241, num. 1-2, BERLIN DE, páginas 177-184, HUMBERTO MARTÍN ET AL. 'Activity of the yeast MAP kinase homologue Slr2 is critically required for cell integrity at 37AC' citado en la solicitud ver resumen ver página 179, columna derecha, párrafo 4 - página 180, columna derecha, párrafo 1 ver página 181, columna derecha, párrafo 2 - página 183, columna izquierda, párrafo 3	1-5
P,X	--- J. BIOTECHNOL. (1994), 38(1), 81-8 CODEN: JBITD4;ISSN: 0168-1656, ALVAREZ, PABLO ET AL 'A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity' ver resumen ver página 82, columna izquierda, párrafo 4 - columna derecha, párrafo 1 ver página 83, columna derecha, ultimo párrafo - página 87, columna izquierda, párrafo 3	1-5

2.

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (Julio de 1992)

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional
**SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**



(51) Clasificación Internacional de Patentes⁶ : C12N 1/06	A3	(11) Número de publicación internacional: WO 96/02629 (43) Fecha de publicación internacional: 1 de Febrero de 1996 (01.02.96)
(21) Solicitud internacional: PCT/ES95/00088 (22) Fecha de la presentación internacional: 14 de Julio de 1995 (14.07.95) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9401536 14 de Julio de 1994 (14.07.94) ES (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID [ES/ES]; Rectorado, Avenida de Séneca, 2, E-28040 Madrid (ES). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US): NOMBELA CANO, César [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). ALVAREZ ALVAREZ, Pablo [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). SAMPEDRO MARTINEZ, Marta [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). DE LA FUENTE CARRETERO, Jesús [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES). MOLINA MARTIN, María [ES/ES]; Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia - Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES).	(81) Estados designados: AU, CA, JP, US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Con reivindicaciones y declaración.</i> (88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional: 4 de abril de 1996 (04.04.96) Fecha de publicación de las reivindicaciones y declaración: 23 de mayo de 1996 (23.05.96)	
(54) Title: PROCESS FOR RELEASING HETEROLOG PROTEINS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE STRAINS (54) Título: PROCEDIMIENTO DE LIBERACION DE PROTEINAS HETEROLOGAS DE CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE (57) Abstract <p>The invention relates to a process for releasing intracellular heterolog proteins in the <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> yeast based on the osmotic sensitivity which confers the mutation <i>slt2</i> at the temperature of 37 °C. Said osmotic sensitivity may be used for releasing the intracellular content either by change of temperature of the culture from 24° to 37° C, or by transfer of grown cells in an osmotically stabilized medium at said second temperature to a non-stabilized medium. In both cases, the cells undergo a lysis and release their intracellular content and, after centrifugation to eliminate the cellular rests, a preparation of proteins is obtained which is appropriate to initiate a process of purification of the protein of interest. This process results in a cost reduction since the use of equipment is avoided and the preparation of proteins which is obtained contains less impurities than that which is obtained through other processes.</p> (57) Resumen <p>Se describe un procedimiento para lograr la liberación de proteínas heterólogas intracelulares en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> basada en la sensibilidad osmótica que confiere la mutación <i>slt2</i> a la temperatura de 37 °C. Esta sensibilidad osmótica puede ser utilizada para la liberación del contenido intracelular bien por cambio en la temperatura del cultivo de 24° a 37 °C, o bien por transferencia de células crecidas en medio estabilizado osmóticamente a esta última temperatura a un medio no estabilizado. En ambos casos las células se lisan liberando su contenido intracelular obteniéndose, tras una centrifugación que elimina los restos celulares, una preparación de proteínas apta para iniciar un proceso de purificación de la proteína de interés. Este procedimiento resulta en un abaratamiento del proceso al evitar el uso de maquinaria, y la preparación de proteínas que se obtiene contiene menos impurezas que la obtenida por otros procesos.</p>		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	GB	Reino Unido	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Niger
BE	Bélgica	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BF	Burkina Faso	HU	Hungría	NO	Noruega
BG	Bulgaria	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BJ	Benin	IT	Italia	PL	Polonia
BR	Brasil	JP	Japón	PT	Portugal
BY	Belarús	KE	Kenya	RO	Rumania
CA	Canadá	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CF	República Centroafricana	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CG	Congo	KR	República de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KZ	Kazajstán	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	República Eslovaca
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CS	Checoslovaquia	LV	Letonia	TG	Togo
CZ	República Checa	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DE	Alemania	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tobago
DK	Dinamarca	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	US	Estados Unidos de América
FI	Finlandia	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistán
FR	Francia			VN	Viet Nam
GA	Gabón				

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

[recibidas por la oficina Internacional el 15 de abril de 1996 15.04.96);
reivindicaciones originales 1-5 reemplazadas por reivindicaciones 1-6 modificadas (2 páginas)]

1.- Procedimiento de liberación, en porcentajes superiores al 50%, de proteínas heterólogas y otros materiales intracelulares (como productos particulados tipo VLP) producidos en *Saccharomyces cerevisiae*, basado en el empleo de estirpes mutadas en genes que afectan a la integridad celular, estables en condiciones de crecimiento normales de laboratorio (24°C, medios nutritivos sencillos), y capaces de liberar el contenido intracelular por expresión de la correspondiente mutación en condiciones no permisivas.

10

2.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas producidas en cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación número 1, estables en las condiciones de crecimiento adecuadas para la generación de una elevada biomasa celular.

15

3.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación número 1 basado en la sensibilidad osmótica que confieren a las células mutaciones como las que afectan al gen *SLT2* a temperaturas no permisivas como la de 37°C, y que determinan lisis celular de mas del 50% de las células en cultivo. .

20

4.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según las reivindicaciones números 1 y 3 caracterizado porque la obtención de preparaciones de proteínas heterólogas y productos particulados intracelulares se realiza por cualquier técnica que, produciendo la expresión de la mutación correspondiente, conduzca a la pérdida de integridad celular por la sensibilidad osmótica de las células.

25

5.- Procedimiento de liberación de proteínas heterólogas de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* según la reivindicación número 4 caracterizado porque la expresión de las mutaciones puede provocarse en las células capaces de expresar proteínas heterólogas o productos intracelulares particulados (es decir transformadas con el gen o genes correspondientes) mediante choque térmico de cultivos, es decir elevación de la temperatura hasta niveles no permisivos en medios no protegidos osmóticamente, o

30

por choque osmótico de células incubadas a temperatura no permisiva en medio osmoticamente protegido.

- 5 6.- Procedimiento para la obtención de proteínas heterólogas intracelulares y productos particulados caracterizado por el uso de otras especies de levadura diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* en mutantes autolíticos, afectados en genes homólogos del gen *SLT2* o en otros cuya mutación determine pérdida de la integridad celular, usando un choque osmótico o un choque térmico.

DECLARACION SEGUN EL ARTICULO 19

La originalidad de la invención creemos que está asegurada puesto que la publicación en que se describe su utilización para la obtención de proteínas heterólogas ("*A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity*". Alvarez et al. 1994. *Journal of Biotechnology* 28: 81-88) apareció con posterioridad suficiente a la solicitud de patente nacional.

En la publicación previa de nuestro grupo ("*Expression of mutations and protein release by yeast conditional autolytic mutants in batch and continuous cultures*". de la Fuente et al. 1993. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38: 763-770), se describe la liberación de proteínas homólogas como parte de un estudio fenotípico de las cepas mutantes, pero para nada se demuestra su aplicación a proteínas heterólogas, aunque se apunte en la discusión la posibilidad de abordar este último desarrollo.

Por tanto, el descubrimiento del procedimiento útil para liberar proteínas heterólogas reivindicado, no se había publicado previamente. Además, al describir la citada liberación de proteínas homólogas no se utilizó el choque osmótico como forma de desencadenar la lisis celular. A mayor abundamiento, hubieron de mejorarse las cepas a emplear para la liberación heteróloga para favorecer la estabilidad proteica con respecto a las descritas en la publicación en *Applied Microbiology and Biotechnology*.

Por lo que respecta al procedimiento de liberación de proteínas descrito en la publicación "*Isolation of recombinant proteins from Saccharomyces cerevisiae by use of osmotically fragile mutant strains*" (M. Bröcker. 1994. *Biotechniques* 16:604-610), se puede afirmar que difiere notablemente del reivindicado en nuestra solicitud de patente. Esta diferencia afecta en general a todas las características pero nos podemos fijar especialmente en dos. Por un lado estas últimas (las descritas en *Biotechniques* 16:604-610) son cepas poco estables cuyo crecimiento es difícil ya que sólo tiene lugar en presencia de un estabilizador osmótico sea cual sea la temperatura de incubación (son cepas condicionales osmóticas). Esto contrasta con nuestras cepas (que son termosensibles) que se mantienen perfectamente en cultivo a temperaturas inferiores a 28°C, óptimas para el crecimiento de *S.cerevisiae*, sin ninguna precaución especial y que pueden crecer fácilmente, por tanto, en medio líquido hasta elevadas densidades de biomasa. Por otro lado, dicha publicación (*Biotechniques* 16:604-610) asegura que con su procedimiento nunca se logra la liberación de mas del 20% de la proteína recombinante intracelular al no lisarse mas que ese porcentaje de células, sin que los autores

encuentren una explicación para este fenómeno. Esto contrasta también con la intensa liberación que se logra con nuestro procedimiento.

En función de lo anteriormente expuesto, hemos modificado ligeramente las reivindicaciones y hemos añadido una, para especificar mejor las características específicas, novedosas y diferenciales del procedimiento reivindicado.